

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

Jiang

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

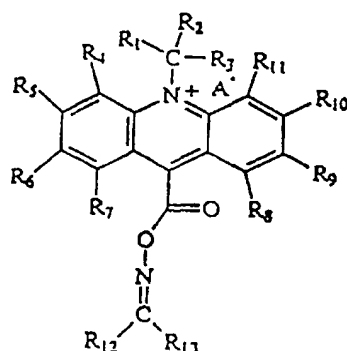


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C07D 219/04, G01N 33/533, C09K 11/06		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/56765 (43) Date de publication internationale: 17 décembre 1998 (17.12.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE98/00087 (22) Date de dépôt international: 10 juin 1998 (10.06.98) (30) Données relatives à la priorité: 9700503 11 juin 1997 (11.06.97) BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOCODE S.A. [BE/BE]; Rue Ernest Solvay 101, B-4000 Liège (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GHITTI, Gianangelo [BE/BE]; Rue Saint-Léonard 364, B-4000 Liège (BE). KOHL, Michel [BE/BE]; Rue J. Destrivaux 12, B-4000 Liège (BE). LEJEUNE, Robert [BE/BE]; Avenue Jean Tasté 129, B-4802 Heusy (BE). RENOTTE, Roger [BE/BE]; Grand'Route 26, B-4360 Oreye (BE). SARLET, Guy [BE/BE]; Avenue Jardon 86, B-4801 Stembert (BE). (74) Mandataire: DE KEMMETER, François; Cabinet Bede, Place de l'Alma 3, B-1200 Bruxelles (BE).			(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

(54) Title: HETEROCYCLIC CHEMOLUMINESCENT DERIVATIVES

(54) Titre: DERIVES CHIMILUMINESCENTS HETEROCYCLIQUES



(I)

(57) Abstract

The invention concerns chemoluminescent acridinium derivatives of formula (I) in which R<sub>1</sub> to R<sub>13</sub> are substituents not hindering the expression of chemoluminescence, provided that at least one of the substituents R<sub>12</sub> and R<sub>13</sub> comprises, as single element or element binding with an acridinium derivative, an atom other than carbon.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des dérivés d'acridinium chimioluminescents de formule (I) dans laquelle R<sub>1</sub> à R<sub>13</sub> sont des substituants n'empêchant pas l'expression de la chimioluminescence, étant entendu que l'un au moins des substituants R<sub>12</sub> et R<sub>13</sub> comporte, comme élément unique ou comme élément de liaison au dérivé d'acridinium, un atome autre que le carbone.

# *UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## Description

DERIVES CHIMIOLUMINESCENTS HETEROCYCLIQUES.Objet de l'invention.

La présente invention concerne des dérivés chimioluminescents d'acridinium ainsi qu'un conjugué comprenant un de ces dérivés, lié à un composant biologique spécifique.

Un autre aspect de l'invention concerne la trousse de diagnostic et/ou de dosage comprenant ce conjugué ou un de ces dérivés, et l'utilisation du conjugué ou d'un de ces dérivés chimioluminescents pour le dosage et/ou la détection d'un composé biologique spécifique.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention.

La chimioluminescence est une formation de lumière obtenue par une réaction chimique. Le mécanisme général de cette réaction a été notamment décrit par Schuster et al (Advances in Physical Organic Chemistry, 187-238 (1984)) par la réaction suivante :



Le composé A, par une réaction chimique, physique ou biochimique (le plus souvent par une oxydation avec un peroxyde) donne un produit à un état excité ("B\*") qui revient à l'état fondamental par l'émission de lumière (hν).

Ce procédé de chimioluminescence est largement utilisé en chimie analytique et en biologie clinique, notamment pour les immunodosages (chemoluminescence immuno

assay ou "CLIA").

Les demandes de brevet EP-A-273115, EP-A-257541 et EP-A-263657 décrivent des composés chimioluminescents hétérocycliques dérivés d'acridinium, de phénantridinium de quinoléinium et d'isoquinoléinium et leurs isomères, 5 éventuellement conjugués à des antigènes, des anticorps ou des acides nucléiques pour être utilisés dans des tests de chimioluminescence.

Le pouvoir chimioluminescent de ces dérivés est 10 calculé par l'émission de lumière engendrée au contact de l'eau oxygénée en milieu alcalin. Des études réalisées par F. McCapra (Accounts of Chemical Research (1976), 9, 6, p. 201-209) ont permis d'établir un mécanisme de chimioluminescence des composés d'acridinium. Il postule 15 la formation d'un intermédiaire réactionnel excité (dioxétane) qui se décompose en CO<sub>2</sub> et en méthylacridone. Il implique également le déplacement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> d'un groupement partant Y. Ce déplacement serait, selon la théorie généralement admise, possible pour des dérivés 20 présentant un groupement Y possédant un pKa inférieur à celui de l'eau oxygénée (pKa < 12).

La demande de brevet WO95/19976 décrit des dérivés hétérocycliques d'acridinium, de phénantridinium, de quinoléinium et d'isoquinoléinium ainsi que leurs isomères 25 et dérivés quelconques obtenus par substitution, améliorés, en particulier des dérivés stables et/ou présentant une chimioluminescence élevée, notamment lorsque la valeur du pKa du groupement partant est élevée, de préférence lorsque le pKa est supérieur à 12.

### 30 Buts de l'invention.

La présente invention a pour but d'obtenir des dérivés d'acridinium apparentés chimiquement à ceux décrits dans la demande de brevet WO95/19976 précitée, de synthèse aisée, qui offrent en outre de nombreuses possibilités 35 d'adaptation comportant notamment une série de modifications chimiques telles que le greffage d'un bras (spacer), le but étant entre autres d'orienter le couplage

vers des fonctions habituellement peu accessibles lors du marquage de protéines telles que les groupements phénols et thiols.

La présente invention a également pour but  
5 d'obtenir des dérivés chimioluminescents caractérisés par une courbe dose - réponse permettant leur utilisation dans le dosage et/ou le diagnostic sur une large plage de concentration.

Un dernier but de la présente invention est  
10 d'obtenir une trousse de diagnostic comprenant ledit dérivé chimioluminescent actif et/ou stable.

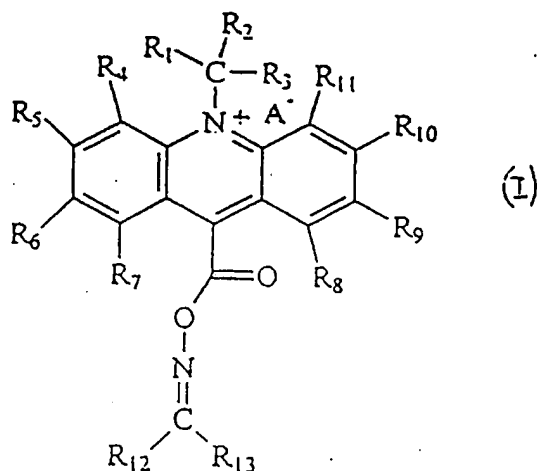
Elements caractéristiques de l'invention.

La présente invention concerne des dérivés  
d'acridinium chimioluminescents de formule :

15

20

25



dans laquelle  $R_1$  à  $R_{11}$  sont des substituants n'empêchant pas l'expression de la chimioluminescence, étant entendu que l'un au moins des substituants  $R_{12}$  et  $R_{13}$  comporte, comme élément unique ou comme élément de liaison au dérivé d'acridinium, un atome autre que la carbone.

De préférence, dans les dérivés chimioluminescents selon l'invention, A est un ion complémentaire choisi parmi les ions halogéno, nitrate, sulfate, iodomercurate, trifluorométhanesulfonate, tartrate  
35 et phtalate,  $R_1$  à  $R_{11}$  sont l'hydrogène ou des radicaux de

type  $R_{1,}$  ou  $B-R_{1,}$  où B représente un groupe ou un atome de liaison et  $R_{1,}$  représente un radical hydrocarboné pouvant contenir un ou plusieurs hétéroatomes,  $R_{1,2}$  et  $R_{1,3}$  sont des substituants identiques ou différents dont la fonction  
5 porte sur la chimioluminescence et sur le couplage, l'un des substituants  $R_{1,2}$  et  $R_{1,3}$  comportant comme élément unique un atome d'halogène ou comportant comme élément de liaison au dérivé d'acridinium un atome choisi parmi les azotides et les chalcogènes, tandis que l'autre des substituants  $R_{1,2}$   
10 et  $R_{1,3}$  est semblable aux substituants  $R_1$  à  $R_{11}$ , à l'exception de l'hydrogène.

De préférence, dans les dérivés chimioluminescents selon l'invention, B représente dans la formule  $B-R_{1,}$ , un groupe  $-(CH_2)_n-$  où n représente un  
15 nombre entier de 1 à 5, B représente également un groupe contenant un azotide ou représente un chalcogène, de préférence un groupe azoté ou l'oxygène deux fois liés,  $R_{1,}$  étant tel que défini précédemment. Et plus particulièrement,  $R_{1,}$  est un radical choisi parmi le groupe  
20 constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle et hétéroarylkyle éventuellement substitués.

Plus particulièrement encore, dans ces dérivés chimioluminescents,  $R_1$  et  $R_{11}$  sont l'hydrogène, l'un des  
25 substituants  $R_{1,2}$  et  $R_{1,3}$  est un substituant choisi parmi les halogènes et les groupes  $B-R_{1,}$ , l'autre des substituants  $R_{1,2}$  et  $R_{1,3}$  étant semblable à  $B-R_{1,}$  ou à  $R_{1,}$ , B et  $R_{1,}$  étant tels que définis précédemment.

Selon une forme d'exécution préférée, de  
30 l'invention, les dérivés chimioluminescents sont les composés;

[1-éthoxy-1-(4-carboxyphényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

35 {1-éthoxy-1-[4-(2-bromoéthoxy)-phényl]-1-iminométhane}-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

(1-chloro-1-phényl-1-iminométhane)-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

5 [1-benzyloxy-1-(4-carboxyphényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

[1-chloro-1-(3-cyanophényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

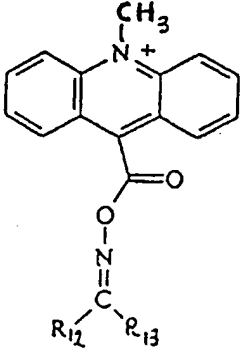
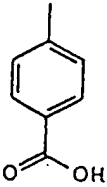
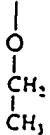
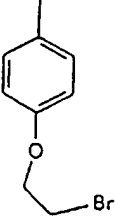
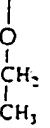
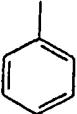

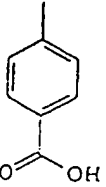
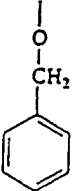
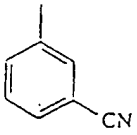

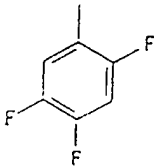

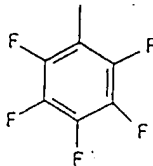

10 [1-chloro-1-(2,4,5,-trifluorophényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

(1-chloro-1-perfluorophényl-1-iminométhane)-10-méthylacridinium-9-carboxylate.

15 Ces dérivés sont désignés par les références OX<sub>1</sub> à OX<sub>7</sub>, respectivement et leurs formules de structure sont reprises au tableau 1 qui suit.



Tableau 1: dérivés de type OX synthétisés	Dérivé	R <sub>12</sub>	R <sub>13</sub>
	OX1		
	OX2		
	OX3		
	OX4		
	OX5		
	OX6		
	OX7		

Un autre aspect de l'invention concerne le conjugué comprenant un dérivé chimioluminescent selon l'invention lié à un composant biologique spécifique.

On entend par "composé biologique spécifique",  
5 toute molécule biologique (lipide, saccharide, protéine, peptide, acide nucléique,...) ou ensemble de molécules biologiques, spécifiques d'une espèce (virale, bactérienne, végétale, animale ou autre), d'un individu, d'une  
10 pathologie (telle que le cancer ou causée par un agent viral, bactérien ou autre), d'une activité ou d'un système biochimique (telle qu'une réaction enzymatique,...).

Ledit composant biologique est susceptible d'être détecté et/ou dosé, ou susceptible de servir au dosage et/ou à la détection d'un composant biologique spécifique.

15 De préférence, ce composé biologique spécifique est choisi parmi le groupe constitué par les anticorps, les haptènes, les antigènes, les acides nucléiques, les agonistes, les transporteurs cellulaires, les acides gras, les lipides et/ou un mélange d'entre eux.

20 La présente invention concerne également la trousse de diagnostic et/ou de dosage comprenant le conjugué ou un des dérivés chimioluminescents selon l'invention et l'utilisation du conjugué et/ou d'un dérivé chimioluminescent selon l'invention pour le dosage et/ou la  
25 détection d'un composé biologique spécifique.

#### Brève description des Figures.

La figure 1 représente un schéma général de préparation des dérivés OX.

30 La figure 2 représente le schéma de synthèse du dérivé OX7.

La figure 3 illustre la cinétique des Ac (anticorps) marqués par OX3, OX5, OX6 et OX7.

Les figures 4 à 6 illustrent la stabilité des Ac marqués par OX6, OX7 et OX5 respectivement.

35 Dans les figures 3 à 6, le signal est exprimé par le rapport entre l'intensité (en RLU) mesurée au temps t et l'intensité (en RLU) mesurée au temps t=0.

La figure 7 représente l'évolution de la concentration en produit OX7 en fonction du temps dans un tampon à pH 8.

La figure 8 représente un exemple de dosage de  
5 TSH avec Ac marqué par OX7.

La figure 9 représente le spectre infrarouge du pentafluorobenzaldéhyde.

La figure 10 représente le spectre infrarouge de la pentafluorobenzaldoxime.

10 La figure 11 représente le spectre infrarouge de la pentafluorobenzaldoxime chlorée.

La figure 12 représente le spectre infrarouge du produit de couplage de la pentafluorobenzaldoxime chlorée avec le chlorure de l'acide 9-acridine carboxylique, étant  
15 le 9-acridine carboxylate de 1-chloro-1-perfluorophényl-1-iminométhane.

Les figures 13 à 15 représentent les spectres infrarouge des marqueurs OX7, OX5 et OX6.

Les figures 16 à 18 représentent les spectres de  
20 masse des marqueurs OX5, OX6 et OX7.

Les composés OX dont les formules sont reprise au tableau 1, ont tous été préparés en suivant le schéma général de préparation décrit dans la figure 1. Leurs synthèses ont nécessité la synthèse de l'aldéhyde de départ  
25 (II) lorsque celui-ci n'était pas directement disponible.

La première étape consiste à former l'oxime (III) par réaction entre l'aldéhyde (II) et de l'hydroxylamine. La réaction est réalisée dans un tampon à pH 4,5-5.

La chloroxime (IV) est préparée par barbotage de  
30 chlore dans une solution d'oxime.

Les chloro-dérivés ont été obtenus directement par couplage de la chloroxime au noyau acridine. Les 3 autres dérivés ont été préalablement traités par un équivalent d'alcoolate sodique avant l'étape de couplage au  
35 noyau acridine. L'alcoolate est préparé à partir de sodium et de l'alcool correspondant.

Les composés IV ou IVb sont couplés au chlorure d'acide carboxylique dans un solvant organique additionné de  $\text{NET}_3$ .

Les produits V ou Vb sont méthylés par le couple  
5 de réactifs  $\text{CH}_3\text{I}/\text{HgCl}_2$  ou le triflate de méthyle.

#### EXEMPLES

##### EXEMPLE 1: MODES OPERATOIRES COMMUNS A CERTAINS DERIVES

(FIG. 1).

1. Synthèse de l'aldéhyde II (pour les dérivés  
10 OX6 et OX7).

Les aldéhydes employés dans la synthèse des dérivés OX6 et OX7 ont été réalisés par réduction des chlorures d'acides correspondants (chlorure d'acide 2,4,5-trifluorobenzoïque ou 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoïque). Le  
15 protocole utilisé est le suivant: un équivalent de chlorure d'acide est mis en présence d'1,1 équivalents de  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  dans du THF. Après réaction, le THF est évaporé sous vide et le résidu traité par de l'eau. Ce dernier est ensuite extrait par de l'éther de pétrole ( $\text{Eb } 40^\circ \text{C}$ ) puis passé sur  
20 charbon. L'aldéhyde est obtenu par évaporation sous vide.

2. Formation de l'oxime III (pour tous les dérivés).

Un équivalent d'aldéhyde dissous dans le l'éthanol est additionné d'eau et de cinq équivalents de chlorhydrate d'hydroxylamine. Le pH est ajusté à une  
25 valeur de 5 par ajout de NaOH à 5 %. Le solvant organique est évaporé et l'oxime formée est extraite au toluène. La solution organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et passée sur charbon. Elle est ensuite concentrée sous vide et additionnée de pétroléine  $40^\circ \text{C}$ . Le refroidissement de la  
30 solution à  $-20^\circ \text{C}$  provoque la cristallisation de l'oxime.

3. Transformation en chloroxime IV (pour tous les dérivés).

La chloroxime est préparée par barbotage de chlore dans une solution d'oxime dans un mélange  
35  $\text{CHCl}_3$ /dioxane préalablement refroidi à  $0^\circ \text{C}$ . La réaction est complète et la chloroxime (III) est directement obtenue par évaporation des solvants suivie, lorsque la chloroxime

est solide à température ambiante, d'une recristallisation par ajout de pétroléine 40° C. (la chloroxime des dérivés OX6 et OX7 est liquide).

5           4. Etape de réaction avec un alcoolate (pour dérivés OX1, OX2 et OX4).

          Obtention du produit IVb.

          L'alcoolate est préparé par réaction entre un équivalent de sodium et d'un équivalent d'alcool (éthanol ou phénol). La réaction est effectuée dans l'alcool  
10 lorsque c'est possible (éthanol) ou dans l'acétone (phénol).

          Un équivalent de chloroxime dissous dans l'acétone est directement mis en réaction avec un équivalent d'alcoolate. Le pH du milieu est ajusté à 4,5  
15 par ajout de HCl concentré et le précipité formé (NaCl) est éliminé par filtration ou par centrifugation. La solution est additionnée d'eau. L'évaporation des solvants organiques provoque la cristallisation du produit.

20           5. Couplage à l'acridine (pour tous les dérivés).  
          Obtention du produit VIb.

          L'acide acridine carboxylique est transformé en chlorure d'acide dans du chlorure de thionyle porté à reflux. Après transformation complète de l'acide, le chlorure de thionyle est évaporé sous vide.

25           Un équivalent des composés préparés aux étapes 3 (OX3, OX5, OX6 et OX7) ou 4 (OX1, OX2 et OX4) sont couplés avec un équivalent de chlorure d'acide acridine carboxylique dans du THF additionné d'un excès de pyridine. Le THF est évaporé sous vide et le résidu repris dans du  
30 toluène. On lave la phase toluénique à l'eau puis on la sèche sur du sulfate sodique anhydre. Le produit formé est soit cristallisé par ajout d'éther de pétrole (Eb 40° C) à la solution (OX1, OX2, OX3, OX4 et OX5) ou chromatographié sur une colonne de silice en utilisant une phase toluène  
35 /acétate d'éthyle/ acide acétique en proportions 2/1/0,01 (OX6 et OX7). Les fractions correspondant au premier produit qui sort de la colonne sont récupérées et

concentrées sous vide. L'addition d'éther de pétrole (Eb 40° C) provoque la cristallisation du produit.

6. Méthylation des composés (pour tous les dérivés).

Les produits obtenus à l'étape 5 sont méthylés  
5 par le couple de réactifs  $\text{CH}_3\text{I}/\text{HgCl}_2$ . La réaction est réalisée sur un mélange intime de 50 mg de produit avec 50 mg de  $\text{HgCl}_2$  additionné de 1 ml de  $\text{CH}_3\text{I}$ . Elle se déroule dans une bombe portée à 110° C durant 2h30. Après réaction, la bombe est réfrigérée à -20° C. Après  
10 refroidissement et décantation du contenu de la bombe, le surnageant est éliminé et les cristaux de produit méthylé sont lavés successivement par du  $\text{CH}_3\text{I}$  puis par de l'éther diéthylique. Le produit méthylé peut éventuellement être recristallisé dans un mélange acétone/éther diéthylique.

15 EXEMPLE 2: SYNTHÈSE DE LA SONDE OX7 (FIG. 2) OU

(1-CHLORO-1-PERFLUOROPHENYL-1-IMINOMETHANE)-10-METHYLACRIDINIUM-9-CARBOXYLATE.

1. Préparation de la pentafluorobenzaldoxime (I).

20 g de pentafluorobenzaldéhyde sont mis en  
20 solution dans 400 ml d'éthanol. D'autre part, 25 g de chlorhydrate d'hydroxylamine sont solubilisés dans 200 ml d'eau. La solution aqueuse est ajoutée à la solution alcoolique et le pH de la solution résultante est amené à 5 par addition de NaOH 2N. Après transformation complète  
25 (CCM), on cristallise l'oxime par évaporation de l'éthanol de la solution. Le produit est isolé par filtration et lavé abondamment à l'eau. 17,8 g de pentafluorobenzaldoxime sont récupérés après séchage du précipité (rendement 82 %).

30 2. Préparation de la chloropentafluorobenzaldoxime (II).

1 g de pentafluorobenzaldoxime est mis en solution dans 15 ml d'un mélange dioxanne-chloroforme (1:1). Cette solution est refroidie à 0° C et saturée par du chlore. Après 90 minutes de réaction, la transformation  
35 est complète (CCM). Les solvants et l'excès de chlore sont éliminés sous pression réduite et le résidu est utilisé tel quel dans l'étape suivante.

3. Couplage de la chloropentafluorobenzaldoxime (II)  
au chlorure de l'acide 9-acridine carboxylique  
(III).

1,05 g d'acide 9-acridine carboxylique est  
5 transformé en chlorure d'acide par traitement au chlorure  
de thionyle (10 ml) contenant une trace de N, N-  
diméthylformamide pendant 90 minutes à 85° C. L'excès de  
chlorure de thionyle est éliminé sous dépression. Le  
chlorure d'acide (III) obtenu sous forme de chlorhydrate  
10 est mis en suspension dans 20 ml de tétrahydrofurane et  
neutralisé par 5 équivalents (2400 µl) de triéthylamine.  
Le produit obtenu à l'étape précédente est dilué dans 10 ml  
de tétrahydrofurane et additionné à la solution de chlorure  
d'acide. Après 30 minutes de réaction, le solvant est  
15 éliminé sous dépression et le résidu est solubilisé dans un  
minimum de chloroforme. La phase organique est lavée trois  
fois par 40 ml d'eau, décantée et séchée sur sulfate  
sodique anhydre. Le solvant est éliminé au rotavapor et le  
résidu est dilué par un minimum de toluène et abandonné à  
20 la cristallisation à 0° C pendant une nuit. Le produit est  
filtré, lavé par du toluène froid puis par de l'éther de  
pétrole. Il est ensuite séché sous vide en présence d'un  
desséchant. 1,8 g de produit (IV) sont récupérés après  
séchage (rendement 85 %).

25 4. N-méthylation du produit (IV) et obtention du  
traceur chimioluminescent OX7 (V).

50 mg du produit (IV) sont mis en solution dans  
2 ml de dichlorométhane anhydre et traités par 800 µl d'une  
solution à 10% de trifluorométhanesulfonate de méthyle dans  
30 le dichlorométhane. Après 4h de réaction, le produit  
désiré est précipité par addition modérée d'éther dans le  
milieu réactionnel. Le traceur est isolé par filtration et  
lavé successivement par de l'éther diéthylique puis par de  
l'éther de pétrole. 50 mg de  
35 produit (V) sont récupérés (rendement 73%).

## Points de Fusion et données chromatographiques.

Composé N°	Point de fusion (°C)	R <sub>f</sub> CCM	R <sub>f</sub> CCM SIL
		SIL G/UV <sub>254</sub>	RP18W/UV <sub>254</sub>
I	131	0,87	0,70
IV	206-207	0,77	0,31
V	210-213	0,00	0,27

## Phases Mobiles

- 10 CCM SIL G/UV<sub>254</sub>: toluène/acétate d'éthyle/acide acétique (2: 1: 0,04).

CCM DIL RP18W/UV<sub>254</sub>: acétonitrile/tampon phosphate 0,1 M pH=3 (60: 40 heptanesulfonate sodique: 0,1 %).

## EXEMPLE 3: ESSAIS EXPERIMENTTAUX SUR LES SONDES OX.

- 15 1. Rendement de chimioluminescence

Le rendement de chimioluminescence des dérivés OX ne peut pas être déterminé lorsque les molécules sont à l'état libre. Il est mesuré après couplage de ces produits à une protéine. A titre d'exemple, pour les dérivés OX5, 20 OX6 et OX7, le taux d'incorporation sur la protéine est mesuré par une méthode fluorescente.

Pour OX7, on peut aussi quantifier la fluorescence émise par un dérivé de dégradation: l'acridone. Le rendement quantique de la molécule de OX7 conjuguée à un anticorps 25 anti-hCG a été évalué à  $1,10^{19}$  RLU/mole.

## 2. Cinétique d'émission

Toutes les cinétiques d'émission enregistrées avec des dérivés OX sont très rapides. Plus de 95 % du signal est émis dans la seconde suivant l'injection du 30 réactif déclenchant la réaction chimioluminescente. Même couplés, les dérivés de chloroximes conservent cette cinétique particulièrement rapide. A titre d'exemple, la figure 3 reprend les cinétiques observées sur des anticorps (Ac) marqués par les chloro-dérivés.

- 35 3. Etude de stabilité

De tous les oximes synthétisés, les chloroximes apparaissent de loin les plus stables en présence de



protéines. Des mesures réalisées par spectrométrie de masse sur OX7 ne montrent aucune variation significative du spectre de la molécule après une incubation de 45 minutes dans un mélange acétonitrile/eau (proportions 50/50).

5 Cette stabilité chimique permet d'envisager le couplage de la sonde aux protéines via la fonction halogénée de la molécule. Toutes les mesures de stabilité effectuées montrent que les oximes OX5, OX6 et OX7 augmentent  
10 fortement leur stabilité en milieu aqueux après couplage aux protéines. Les premiers résultats d'une étude de stabilité sur des anticorps marqués par ces sondes sont donnés dans les figures 4, 5 et 6. Cette étude est réalisée à 25° C dans des tampons (0,1 M phosphate, 0,15 M NaCl, 0,1 % NaN<sub>3</sub>, 0,1 % BSA) à pH 5, 6 et 7.

15 Dans les conditions expérimentales décrits ci-après, les premiers résultats montrent que la stabilité des traceurs diminue avec la basicité du milieu, ce qui est lié à la nature des sondes. Ils montrent également que le traceur OX5 est nettement moins stable que les traceurs OX6  
20 et OX7. Les cassures observées entre t=470 et t=560 heures sur les courbes des figures 4 et 5 à pH 5 et 6 permettent difficilement de conclure sur la stabilité exacte des traceurs OX6 et OX7 à pH 5 et 6. Toutefois, le traceur OX7 apparaît comme étant le plus stable des trois, et ce  
25 plus particulièrement à pH 5. Cette importante stabilité à pH 5 permet d'envisager une longue conservation du traceur à 4° C. D'un autre côté, la stabilité de celui-ci à pH 7 permet d'envisager tous les immunodosages possible à ce pH.

30 La stabilité de la sonde OX7 est très sensible au pH. En milieu acide (pH 5) la stabilité du composé est nettement plus élevée qu'en milieu basique (pH 8). Lorsque la sonde est fixée à une protéine, sa stabilité augmente fortement et ce quelque soit le pH testé.

### 35 3.1 STABILITE DE LA SONDE OX7 NON COUPLEE A PH 8.

La stabilité de la sonde libre a été testée à 25° C dans un milieu identique à celui employé dans les

réactions de marquage (pH du milieu: 8). La dégradation du produit a été suivie par analyse HPLC en utilisant comme support chromatographique une colonne (4x125 mm) des Lichrosphères RP-18 (5 µm) et comme phase mobile un mélange  
 5 acétonitrile/eau additionné d'acide décane sulfonique, d'hydroxyde de tétraméthyle ammonium et d'acide trifluoroacétique (pH final: 2,5).

La figure 7 présente l'évolution de la concentration en produit OX7 en fonction du temps dans un  
 10 tampon à pH 8.

L'ajustement paramétrique des données présentées par une fonction de type:

$Y = A * \exp(-B * X) + C$  a conduit aux résultats suivants:

Paramètre	Valeur	Approx. SE	95% intervalle de confiance
A	633	constant	0,036 à 0,046
B	0,0415	1,96 E-03	
C	0	constant	

$R^2 = 0,992$ ;  $Sy.x = 18,42$

20 Le temps de demi-vie de la sonde libre obtenu en utilisant l'ajustement paramétrique est de 17 minutes.

### 3.2 STABILITE DE LA SONDE OX7 COUPLEE A UN ANTICORPS.

La stabilité de la sonde OX7 couplée à un anticorps a été testée à pH 5, 6 et 7. Elle a été évaluée  
 25 par mesure de l'activité chimioluminescente d'échantillons de protéine marquée vieillis dans des tampons phosphate/NaCl additionnés de protéines. L'ajustement paramétrique des données recueillies à pH 6 et 7 conduit à des temps de demi-vie de l'ordre de 600 et 375 heures. Par  
 30 contre à pH 5, le temps de demi-vie est nettement plus important (les faibles variations de signal enregistrées sur une période d'environ 2 mois ne permettent pas un ajustement paramétrique valable).

#### 4.1 MARQUAGE D'ANTICORPS ANTI-TSH PAR LA SONDE OX7

35 25 µg d'anticorps en solution dans 100 µl de tampon de marquage (solution 0,1 M phosphate de sodium, 0,15 M NaCl ajustée à pH 8,0) sont additionnés de 10 µl

d'une solution de OX7-méthyltriflate dans l'acétonitrile (solution 0,5 mg/ml). Après homogénéisation, le mélange réactionnel est incubé durant 15 minutes à température ambiante. L'excès de sonde OX7 est neutralisé par ajout de

5 100 µl d'une solution de lysine dans le tampon de marquage (solution 1,5 mg/ml). Après une nouvelle incubation de 5 minutes à température ambiante, le milieu est chromatographié sur une colonne (50x1 cm) de séphadex G25. La colonne chromatographique est équilibrée et éluée avec

10 un tampon 0,1 M phosphate, 0,15 M NaCl. 0,1 % NaN<sub>3</sub>, contenant de la BSA (1g/l) et ajusté à p 5,0. Les fractions chromatographiques sont lues par mesure de chimioluminescence. Les fractions correspondant au pic d'anticorps sont rassemblées et conservées dans le tampon de

15 purification à une température de 4° C.

#### 4.2 DOSAGE DE TSH AVEC LES ANTICORPS MARQUES PAR OX7.

Un dosage non optimisé de la TSH a été réalisé en suivant un protocole identique à un dosage IRMA commercial avec des anticorps anti-TSH marqués par la sonde OX7. Le

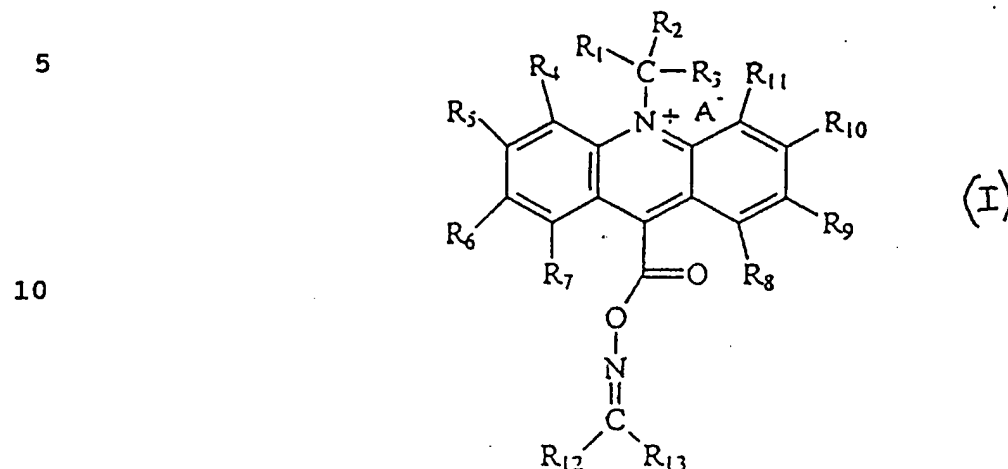
20 protocole utilisé comporte les étapes suivantes:

- préparation du traceur par dilution du pic d'anticorps marqués dans un tampon traceur à pH 7,0 (dilution 50x);
- remplissage des différents tubes coatés avec 200 µl de standards (0, 0,15, 0,5, 1.5, 4, 15, 50 et 85 µl/ml);
- 25 • agitation durant 2h à température ambiante;
- aspiration du contenu de chaque tube;
- rinçage des tubes avec un tampon de lavage (opération réalisée 2 fois) et élimination de la phase liquide par aspiration;
- 30 • lecture de la chimioluminescence des différents tubes.

La courbe de calibration obtenue (Fig. 8) montre que des anticorps marqués par la sonde OX7 peuvent parfaitement convenir comme traceur chimioluminescent dans le cadre d'un dosage nécessitant une grande sensibilité.

## REVENDICATIONS

1. Dérivés d'acridinium chimioluminescents de formule:



dans laquelle  $R_1$  à  $R_{11}$  sont des substituants n'empêchant pas l'expression de la chimioluminescence, étant entendu que l'un au moins des substituants  $R_{12}$  et  $R_{13}$  comporte, comme élément unique ou comme élément de liaison au dérivé d'acridinium, un atome autre que le carbone.

2. Dérivés chimioluminescents suivant la revendication 1, caractérisés en ce que:

A est un ion complémentaire choisi parmi les ions halogéno, nitrate, sulfate, sulfonate, iodomercurate, trifluorométhane sulfonate, tartrate et phtalate,

$R_1$  à  $R_{11}$  sont l'hydrogène ou des radicaux de type  $R_{14}$  ou  $B-R_{14}$ , où B représente un groupe ou un atome de liaison et  $R_{14}$  représente un radical hydrocarboné pouvant contenir un ou plusieurs hétéroatomes,

$R_{12}$  et  $R_{13}$  sont des substituants identiques ou différents dont la fonction porte sur la chimioluminescence et sur le couplage,

l'un des substituants  $R_{12}$  et  $R_{13}$  comportant comme élément unique un atome d'halogène ou comportant comme élément de liaison au dérivé d'acridinium un atome choisi parmi les azotides et les chalcogènes, tandis que l'autre des substituants  $R_{12}$  et  $R_{13}$  est semblable aux substituants  $R_1$

à  $R_{11}$ , à l'exception de l'hydrogène.

3. Dérivés chimioluminescents suivant la revendication 2, caractérisés en ce que, dans la formule B- $R_{14}$ ,

5 B représente un groupe  $-(CH_2)_n-$ , où n représente un nombre entier de 1 à 5, B représente également un groupe contenant un azotide ou représente un chalcogène de préférence un groupe azoté ou l'oxygène deux fois liés,  $R_{14}$  étant tel que défini précédemment.

10 4. Dérivés chimioluminescents suivant la revendication 3, caractérisés en ce que:

$R_{14}$  est un radical choisi parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle et hétéroarylkyle éventuellement substitués.

15 5. Dérivés chimioluminescents suivant les revendications 3 et 4, caractérisés en ce que:

$R_1$  à  $R_{11}$  sont l'hydrogène,

l'un des substituants  $R_{12}$  et  $R_{13}$  est un substituant choisi parmi les halogènes et les groupes B- $R_{14}$ ,

20 l'autre des substituants  $R_{12}$  et  $R_{13}$  étant semblable à B- $R_{14}$  ou à  $R_{14}$ , B et  $R_{14}$  étant tels que définis précédemment.

6. Dérivés chimioluminescents suivant la revendication 5, de formule:

25 [1-éthoxy-1-(4-carboxyphényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

(1-éthoxy-1-[4-(2-bromoéthoxy)-phényl]-1-iminométhane)-10-méthylacridinium-9-carboxylate

30 ou

(1-chloro-1-phényl-1-iminométhane)-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

35 [1-benzyloxy-1-(4-carboxyphényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

[1-chloro-1-(3-cyanophényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

5 [1-chloro-1-(2,4,5-trifluorophényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

(1-chloro-1-perfluorophényl-1-iminométhane)-10-méthylacridinium-9-carboxylate.

7. Conjugué comprenant un dérivé  
10 chimioluminescent selon l'une quelconque des revendications  
1 à 6 lié éventuellement par l'intermédiaire d'un bras à un  
composant biologique spécifique choisi parmi le groupe  
constitué par les anticorps, les haptènes, les antigènes,  
les acides nucléiques, les agonistes, les transporteurs  
15 cellulaires, les acides gras, les lipides et/ou un mélange  
d'entre eux.

8. Trousse de diagnostic et/ou de dosage  
comprenant le conjugué selon la revendication 7 ou un  
dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

20 9. Utilisation du conjugué selon la revendication  
7 ou d'un dérivé selon l'une quelconque des revendications  
1 à 6, pour le marquage de protéines, le dosage et/ou la  
détection d'un composant biologique spécifique choisi parmi  
le groupe constitué par les anticorps, les haptènes, les  
25 antigènes, les acides gras, les lipides et/ou un mélange  
d'entre eux.

1/14

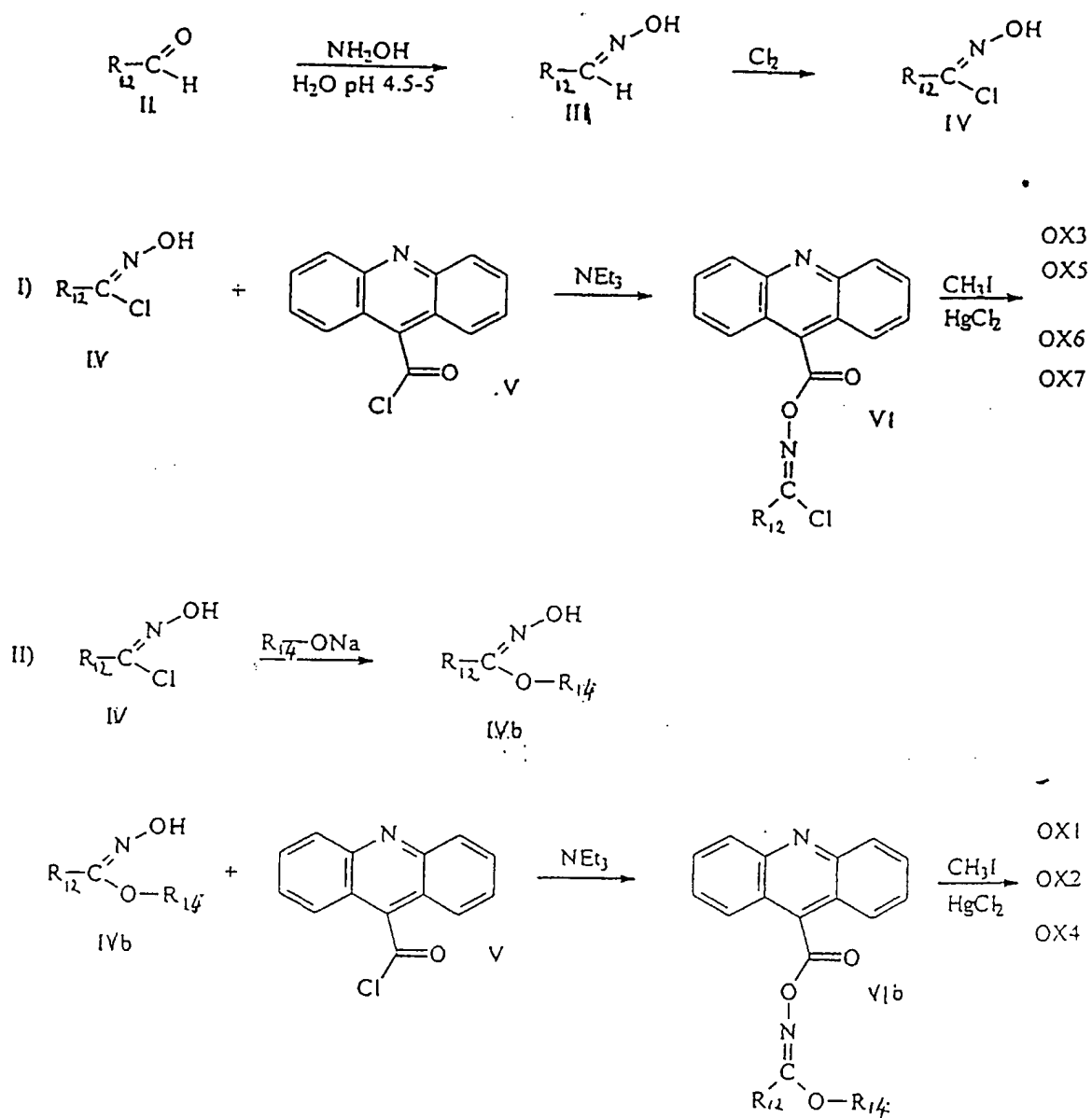


FIG 1

2/14

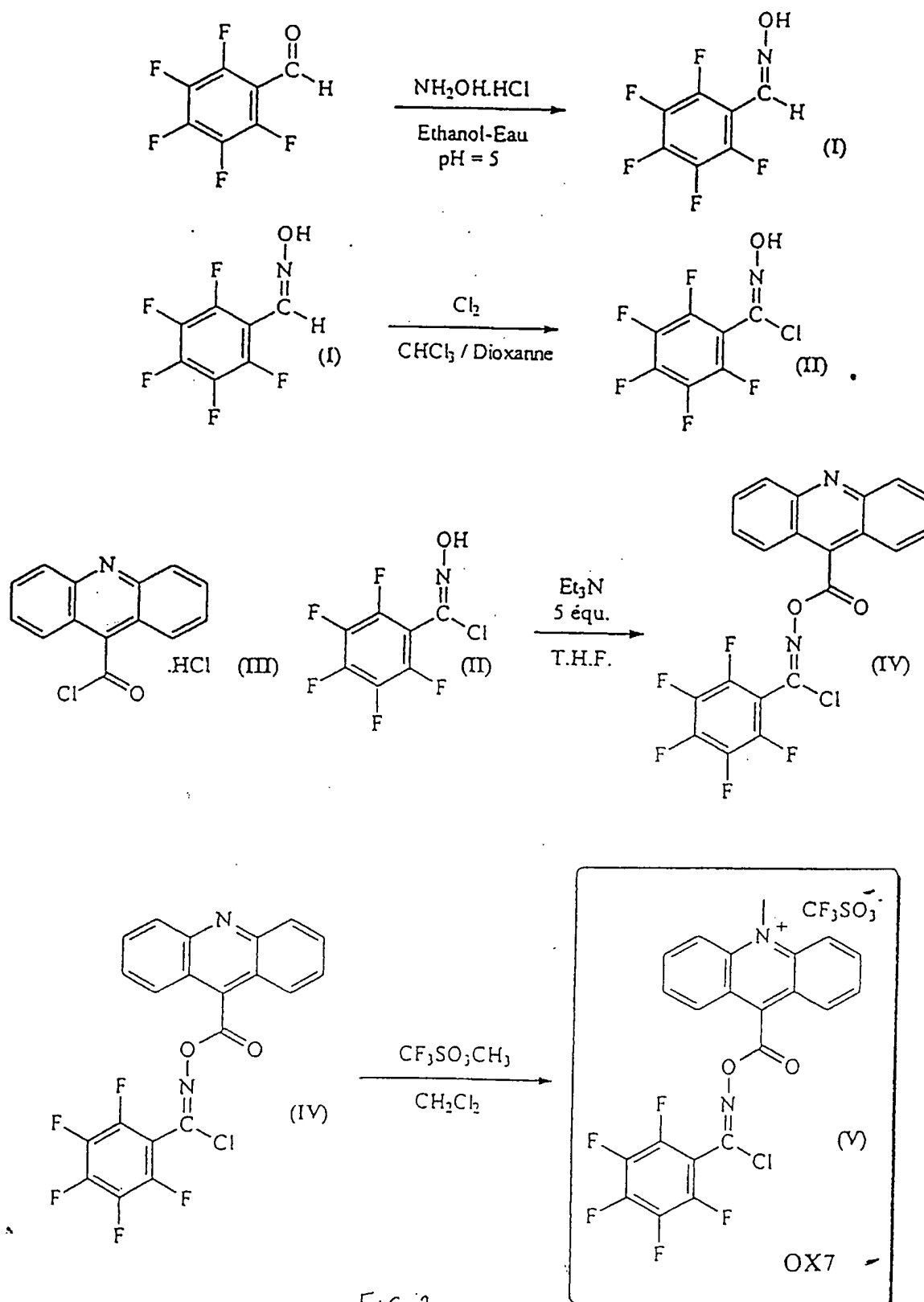
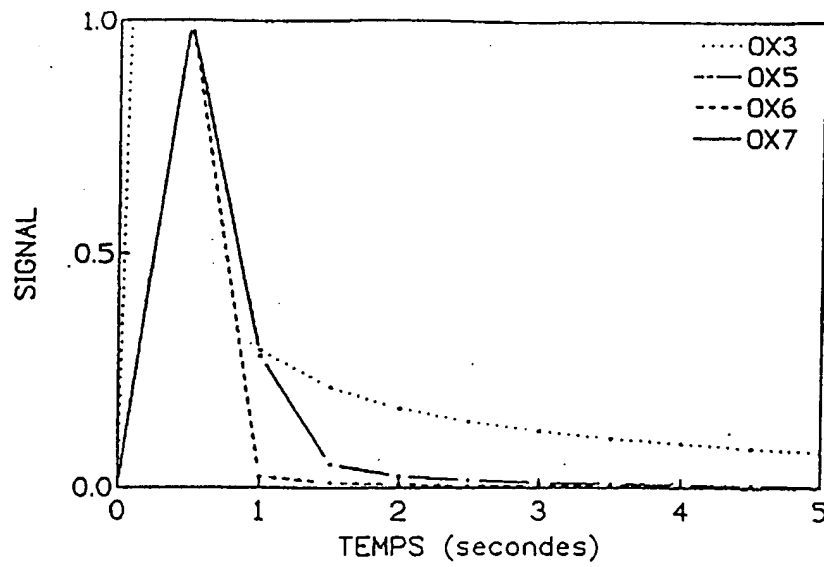
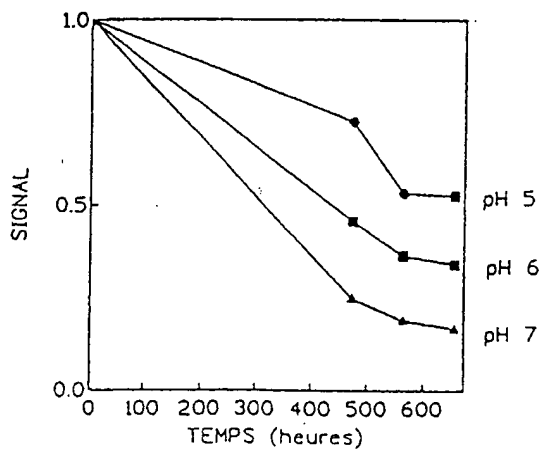
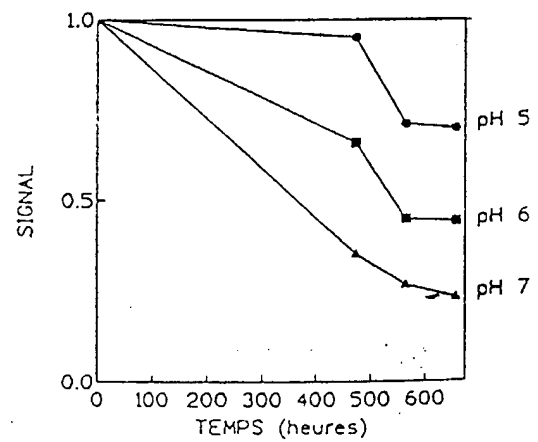


FIG 2



3/14

FIG 3FIG 4FIG 5

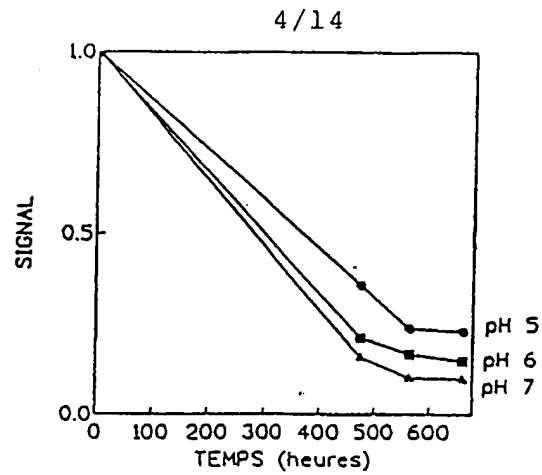


FIG 6

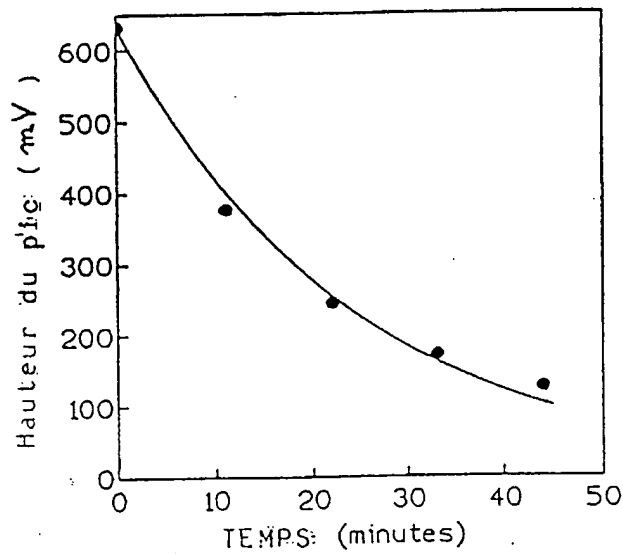
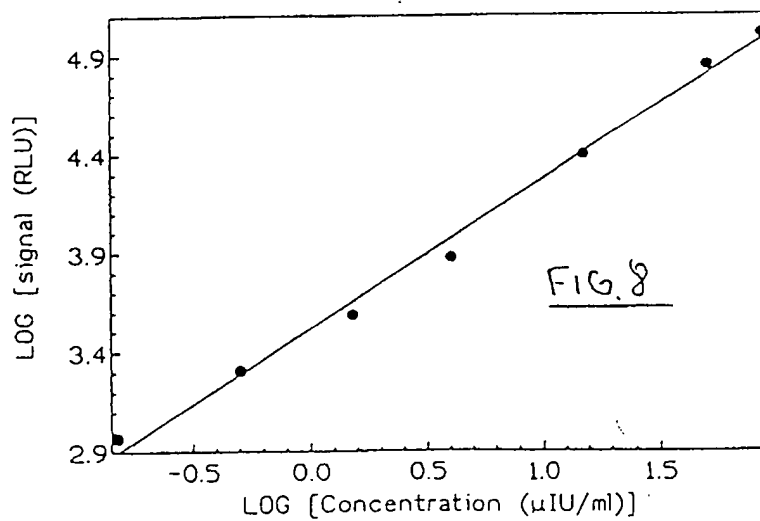
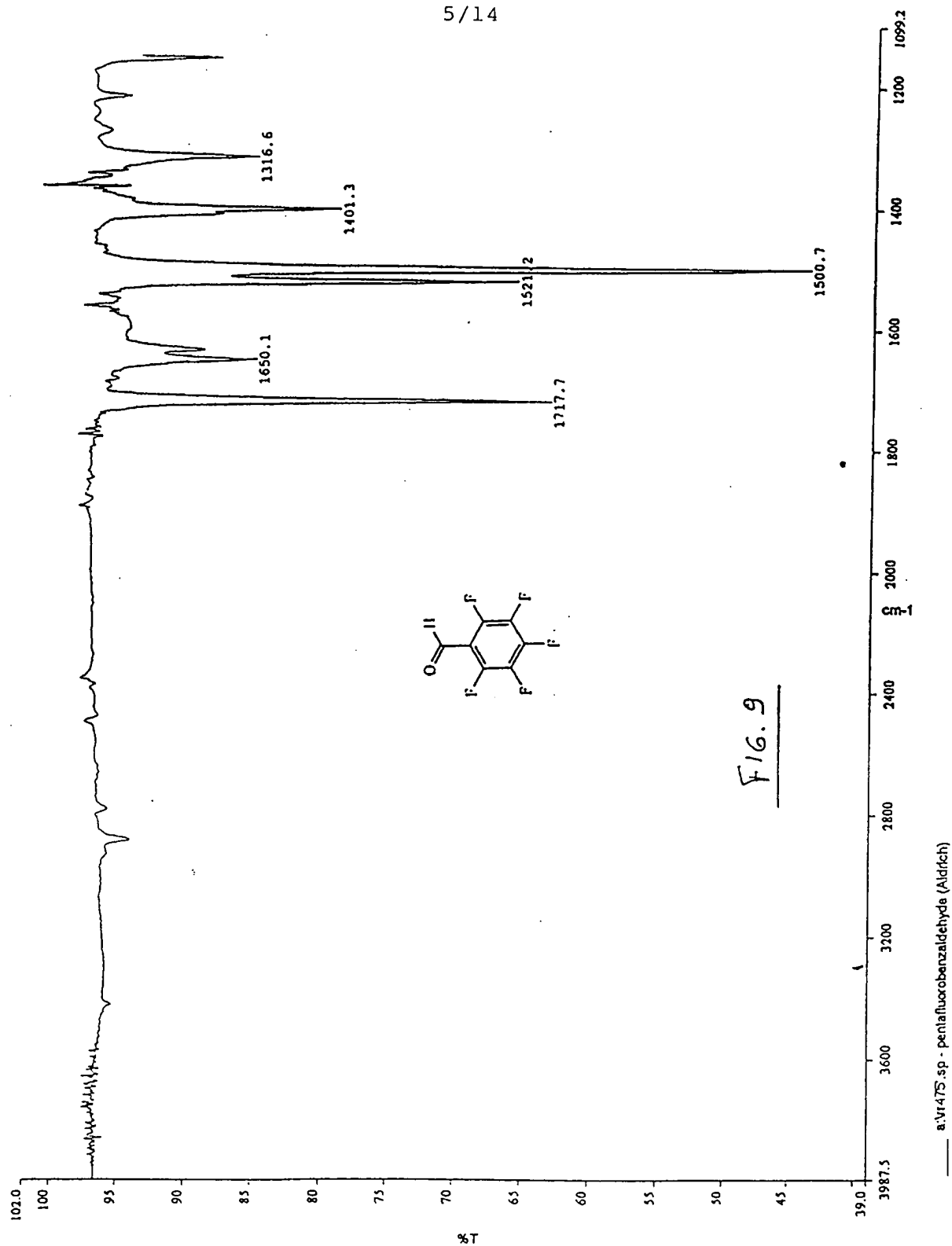


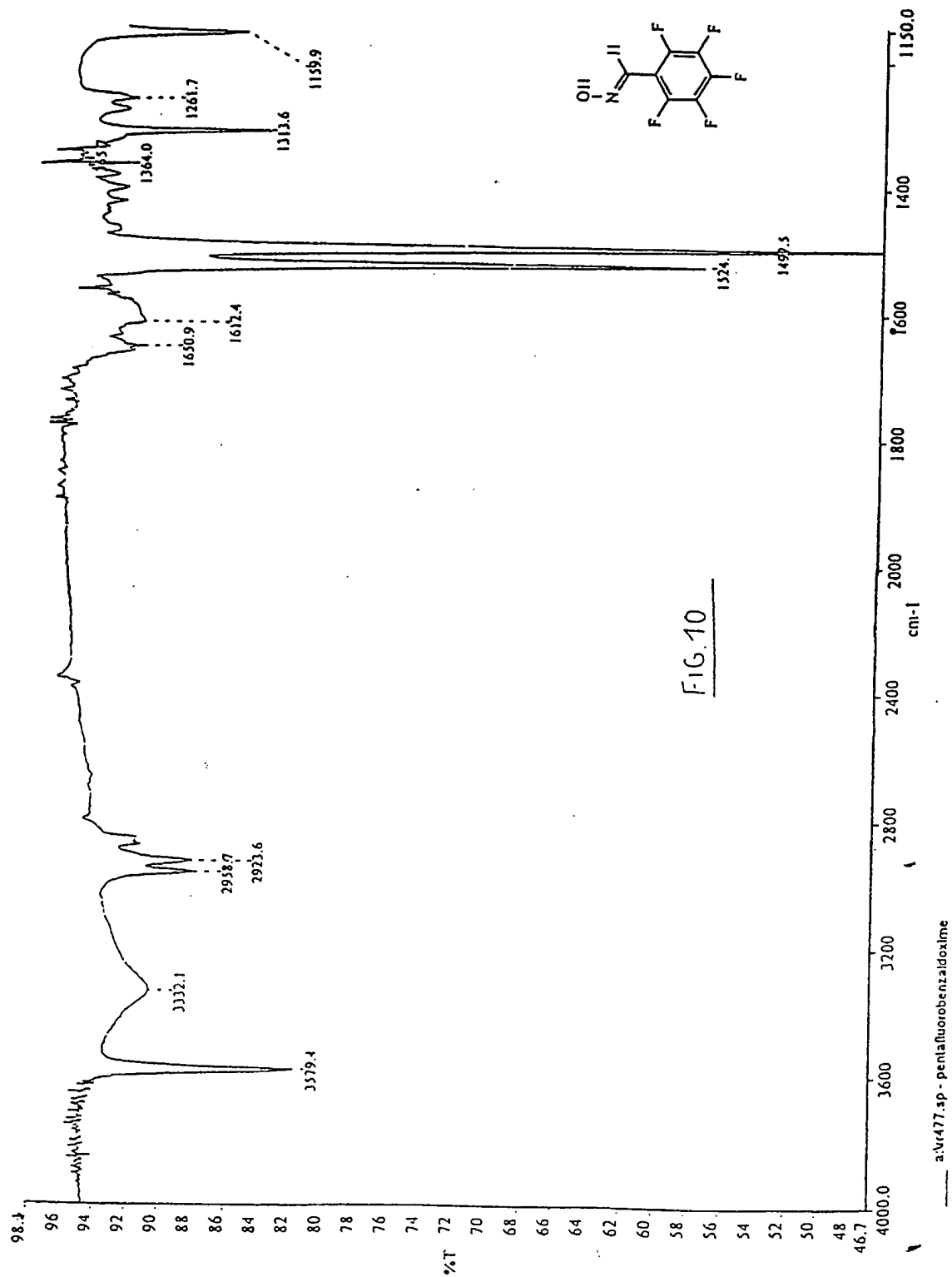
FIG.7



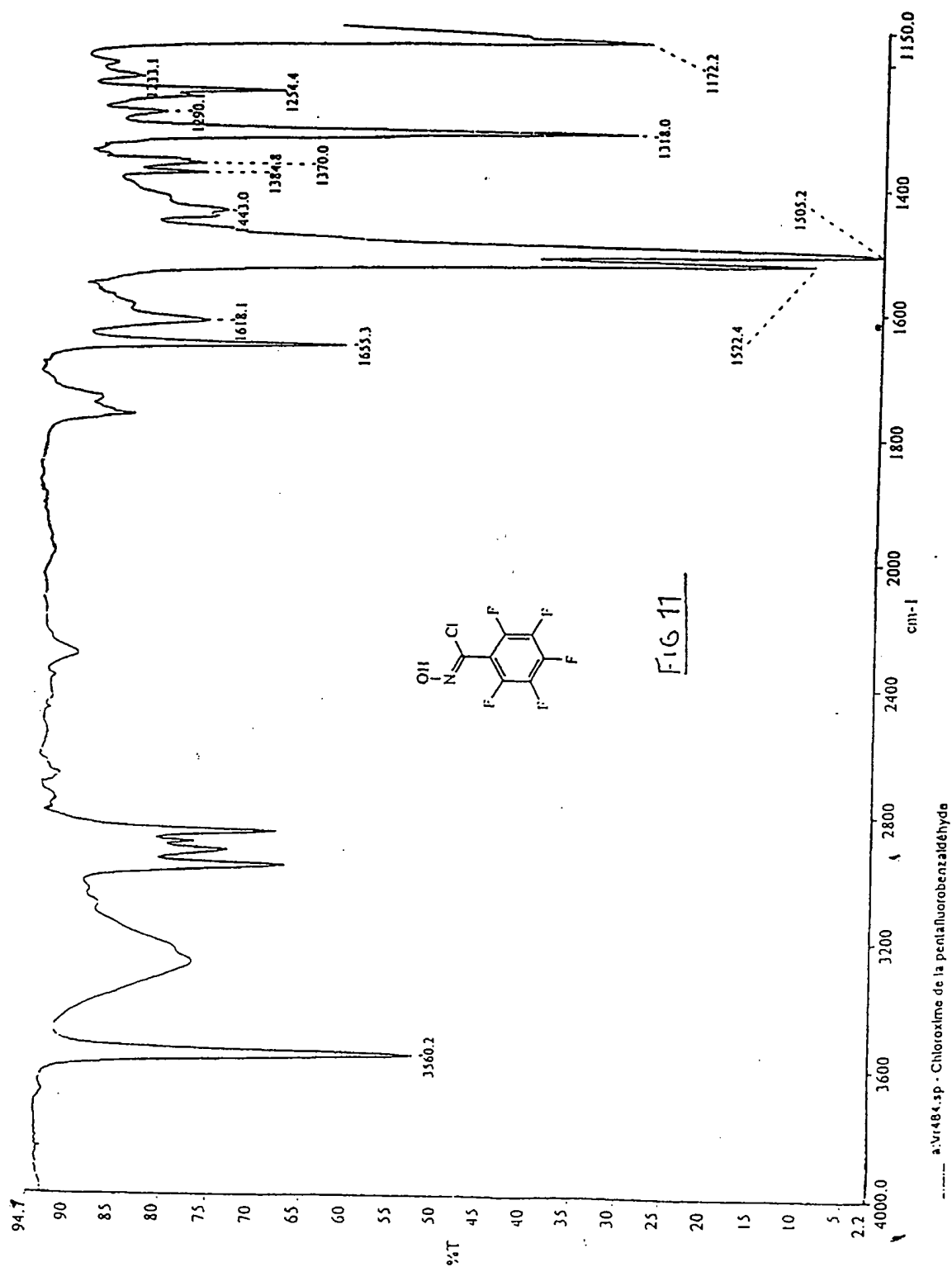
5/14



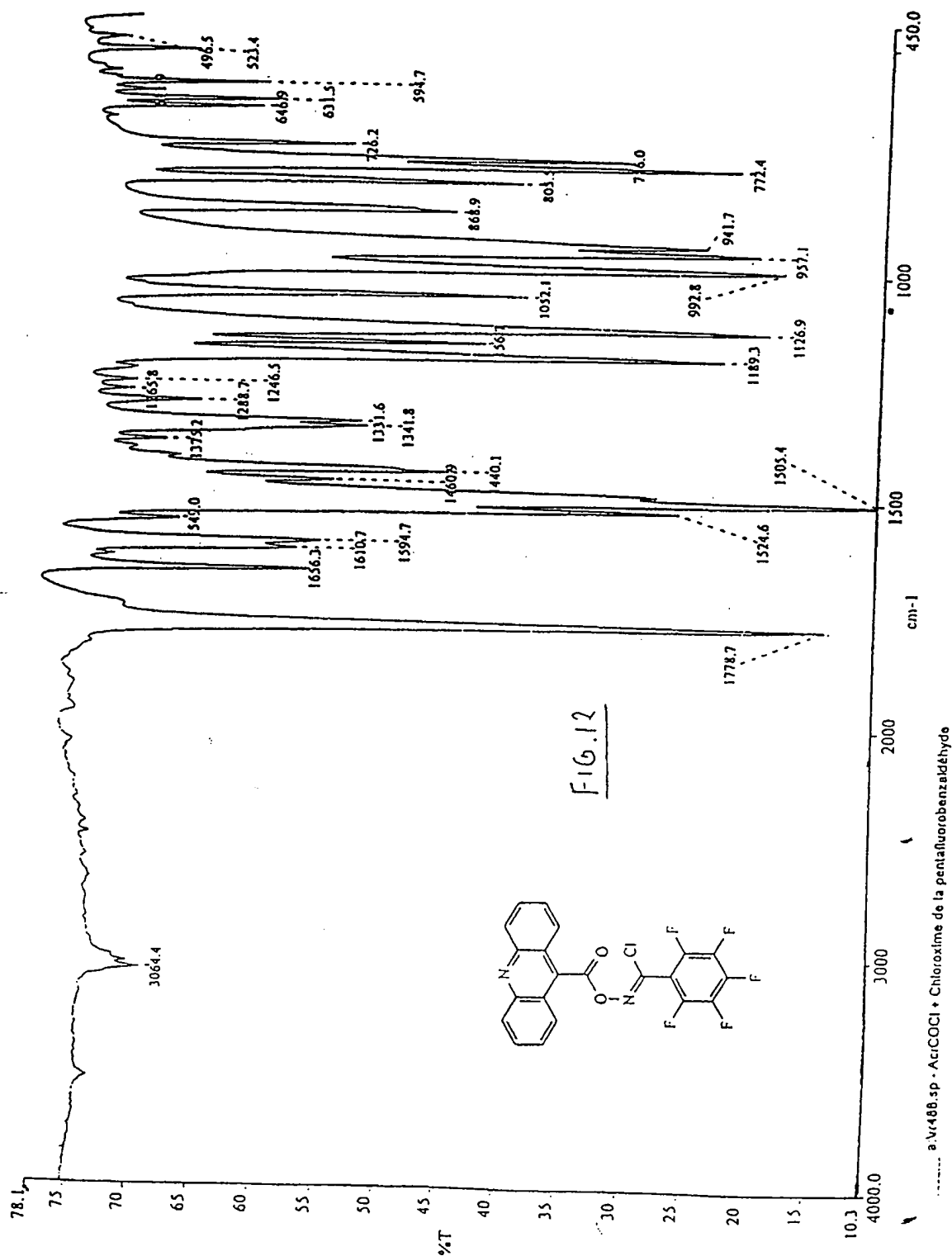
6/14



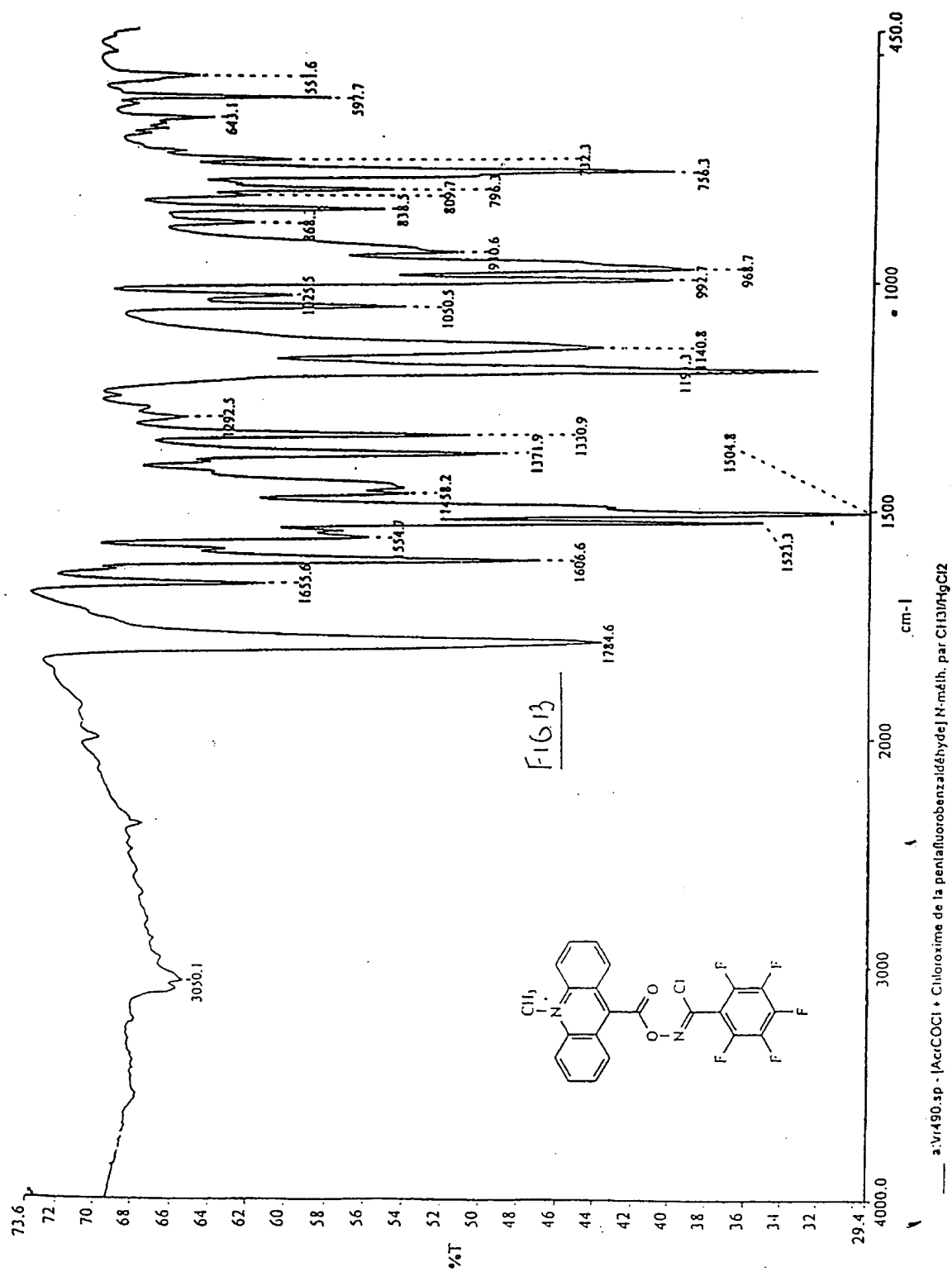
7/14



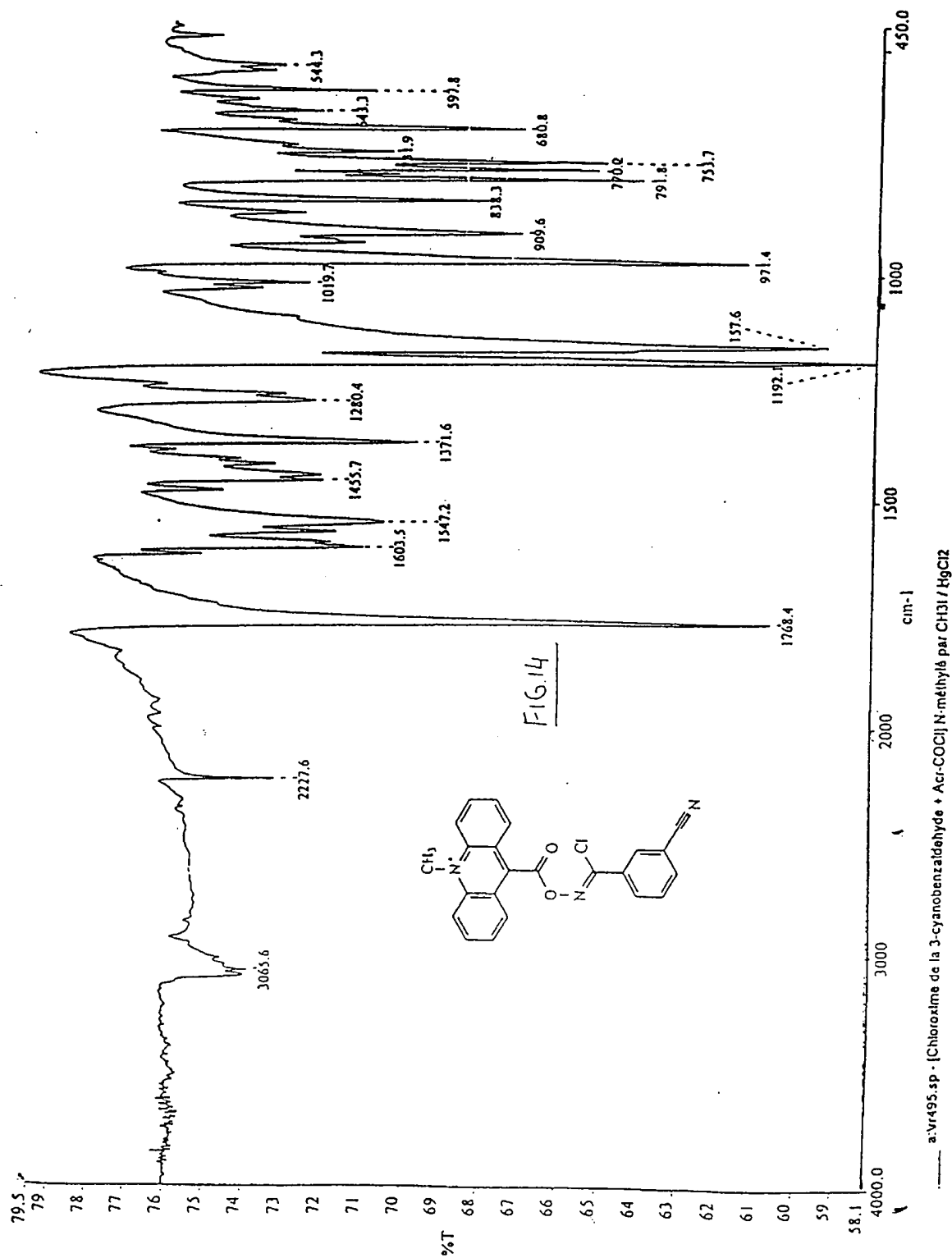
8/14



9 / 14

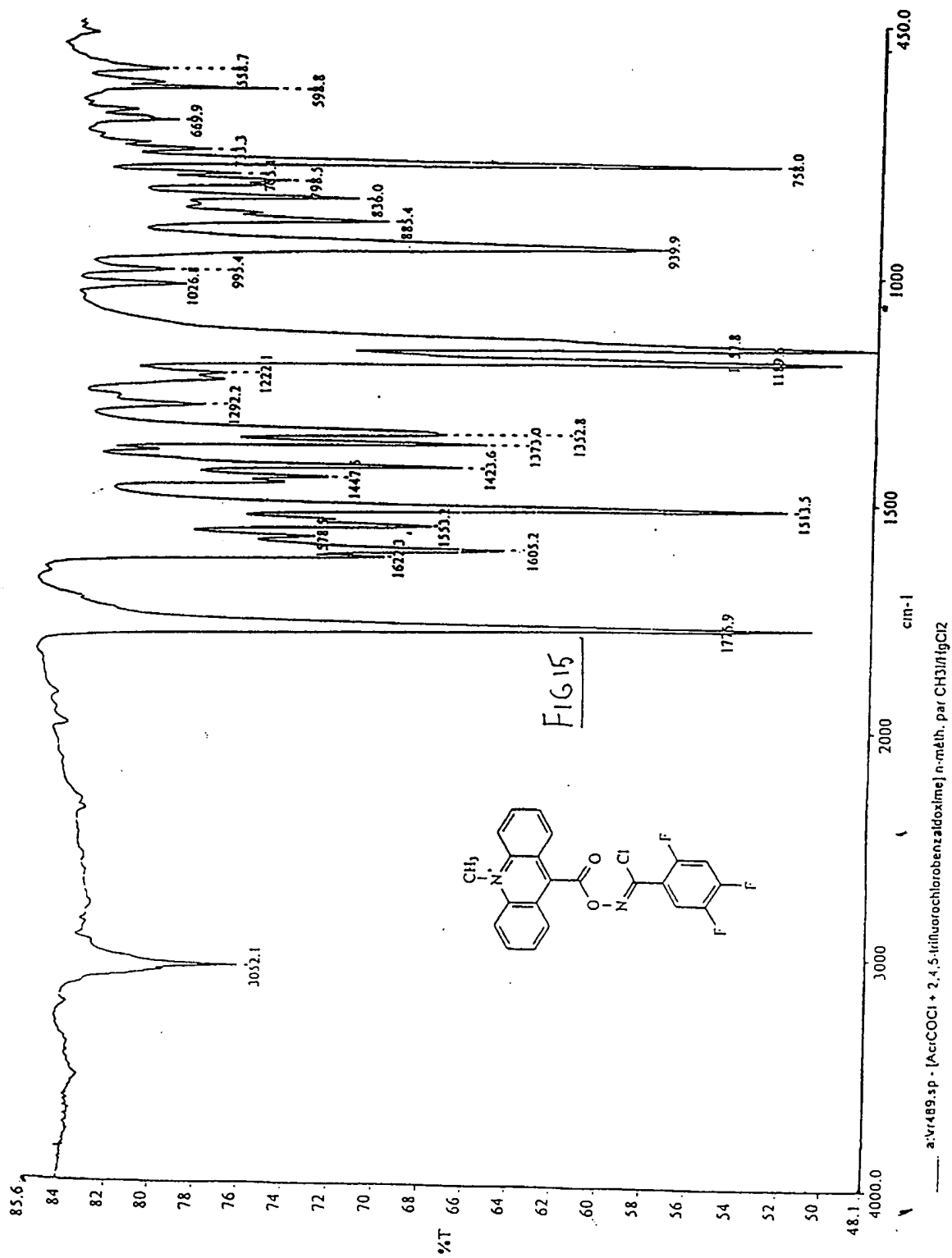


10/14

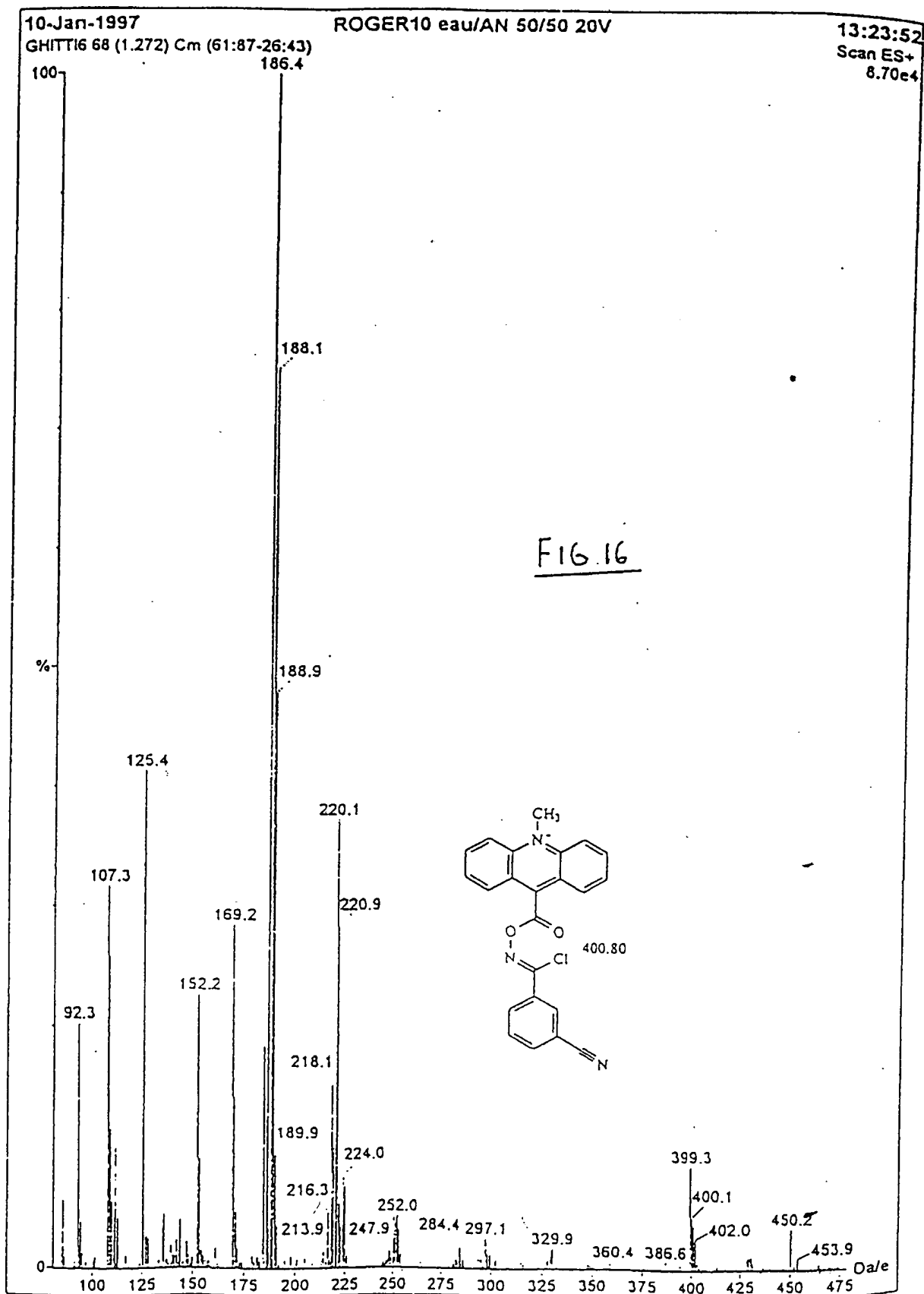




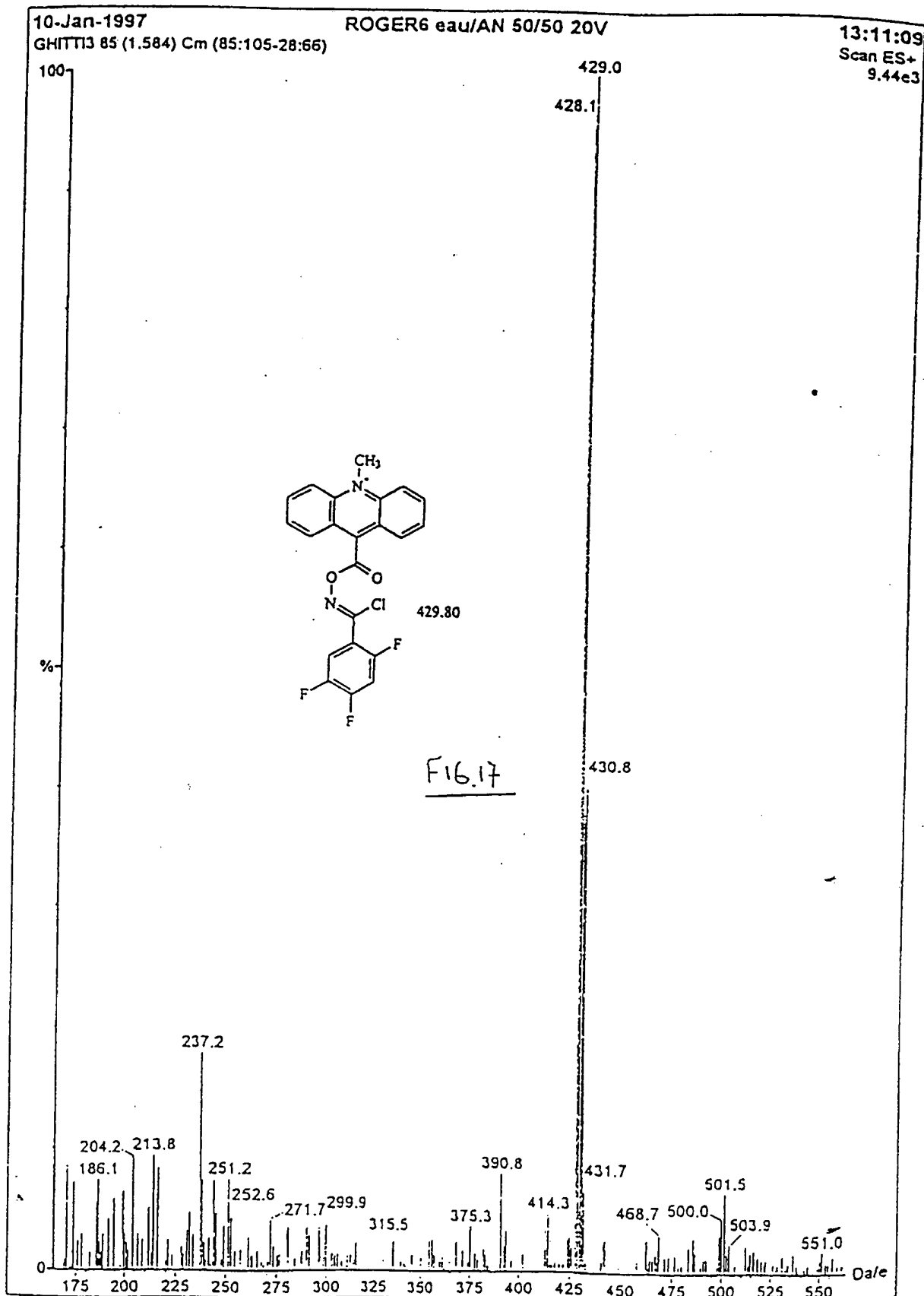
11/14



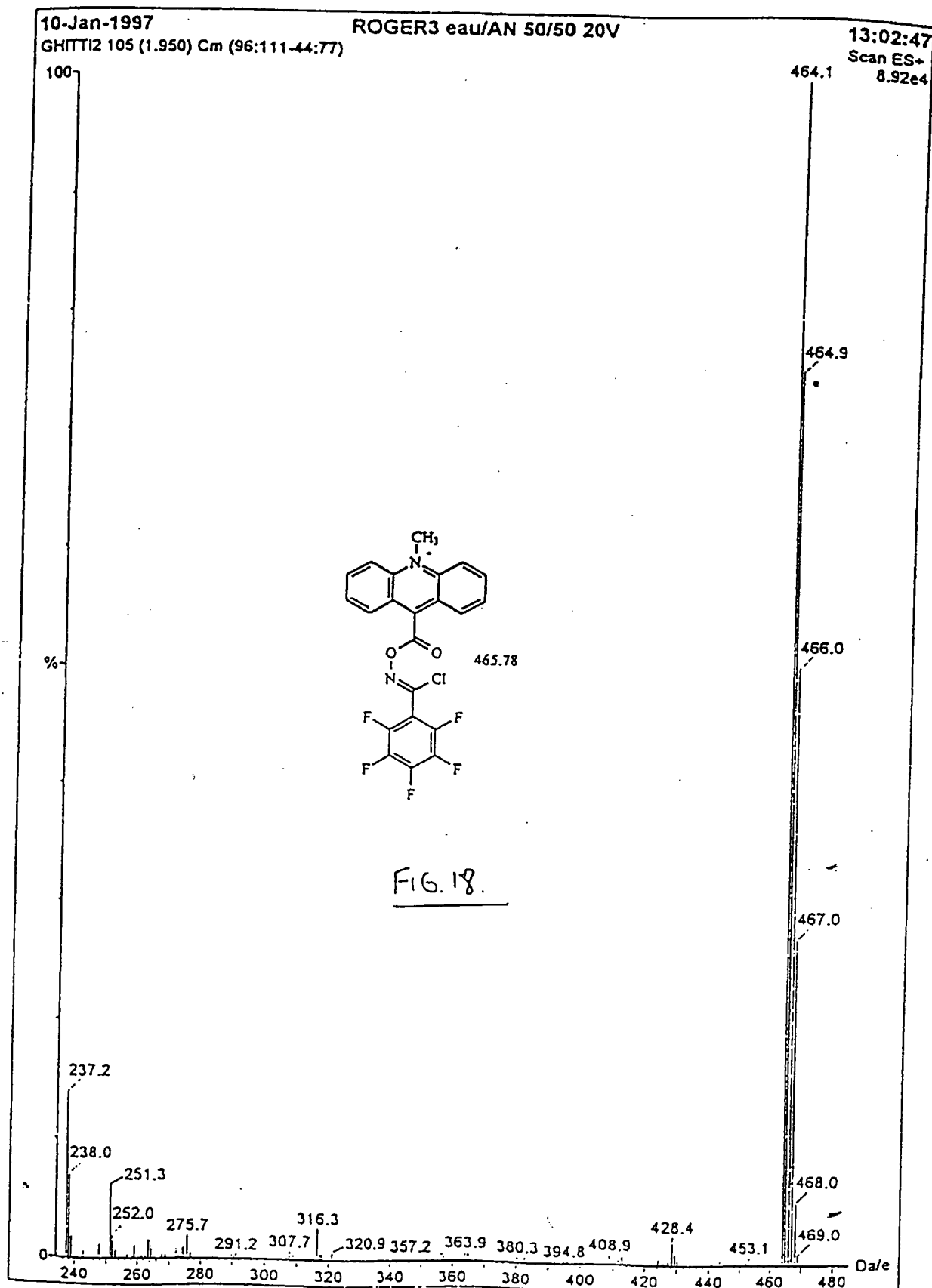
12/14



13/14



14/14



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/BE 98/00087

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D219/04 G01N33/533 C09K11/06

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D G01N C09K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 19976 A (BIOCODE SA) 27 July 1995 cited in the application see page 22, line 10 - page 25, line 30; claims; examples 9,10	1-5,7-9
A	EP 0 263 657 A (CIBA CORNING DIAGNOSTICS CORP) 13 April 1988 cited in the application see claims	1,7-9
A	EP 0 257 541 A (HOECHST AG) 2 March 1988 cited in the application see claims	1,7-9

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 1998

Date of mailing of the international search report

20/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Henry, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No

PCT/BE 98/00087

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9519976 A	27-07-1995	BE 1008216 A AU 1529295 A EP 0741720 A	20-02-1996 08-08-1995 13-11-1996
EP 0263657 A	13-04-1988	US 4745181 A AU 595644 B AU 7910087 A DE 3779040 A JP 1989775 C JP 7002716 B JP 63101368 A US 4918192 A US 5110932 A	17-05-1988 05-04-1990 14-04-1988 17-06-1992 08-11-1995 18-01-1995 06-05-1988 17-04-1990 05-05-1992
EP 0257541 A	02-03-1988	DE 3628573 A AT 132490 T DE 3645292 C DE 3751659 D DK 68492 A DK 171437 B EP 0647628 A ES 2083949 T FI 873609 A, B GR 3019470 T IE 74678 B JP 2766780 B JP 7179428 A JP 1966835 C JP 6099401 B JP 63057572 A NO 177639 B PT 85563 B	25-02-1988 15-01-1996 11-12-1997 15-02-1996 25-05-1992 28-10-1996 12-04-1995 01-05-1996 23-02-1988 30-06-1996 30-07-1997 18-06-1998 18-07-1995 18-09-1995 07-12-1994 12-03-1988 17-07-1995 31-05-1990

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No

PCT/BF 98/00087

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07D219/04 G01N33/533 C09K11/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07D G01N C09K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 19976 A (BIOCODE SA) 27 juillet 1995 cité dans la demande voir page 22, ligne 10 - page 25, ligne 30; revendications; exemples 9,10	1-5,7-9
A	EP 0 263 657 A (CIBA CORNING DIAGNOSTICS CORP) 13 avril 1988 cité dans la demande voir revendications	1,7-9
A	EP 0 257 541 A (HOECHST AG) 2 mars 1988 cité dans la demande voir revendications	1,7-9

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 octobre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/10/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Henry, J

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/BE 98/00087

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9519976 A	27-07-1995	BE 1008216 A	20-02-1996
		AU 1529295 A	08-08-1995
		EP 0741720 A	13-11-1996
EP 0263657 A	13-04-1988	US 4745181 A	17-05-1988
		AU 595644 B	05-04-1990
		AU 7910087 A	14-04-1988
		DE 3779040 A	17-06-1992
		JP 1989775 C	08-11-1995
		JP 7002716 B	18-01-1995
		JP 63101368 A	06-05-1988
		US 4918192 A	17-04-1990
		US 5110932 A	05-05-1992
EP 0257541 A	02-03-1988	DE 3628573 A	25-02-1988
		AT 132490 T	15-01-1996
		DE 3645292 C	11-12-1997
		DE 3751659 D	15-02-1996
		DK 68492 A	25-05-1992
		DK 171437 B	28-10-1996
		EP 0647628 A	12-04-1995
		ES 2083949 T	01-05-1996
		FI 873609 A, B	23-02-1988
		GR 3019470 T	30-06-1996
		IE 74678 B	30-07-1997
		JP 2766780 B	18-06-1998
		JP 7179428 A	18-07-1995
		JP 1966835 C	18-09-1995
		JP 6099401 B	07-12-1994
		JP 63057572 A	12-03-1988
		NO 177639 B	17-07-1995
		PT 85563 B	31-05-1990